中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）46(3)：207～215（1997）

栽培稻與野生稻之雜交第一代胚培養[1]

羅淑芳　陳一心[2]　李成章[3]　蔡新聲[4]

摘要：在許多秈、稉稻與野生稻之雜交試驗中，稉稻臺農67號（TNG67）×野生稻（*O.officinalis* 之W37品系）雜交組合之雜種胚培養結果最佳，授粉後 7～9 天的雜交胚，癒合組織形成率及植株再生率最高；將雜交胚培養於 N6 無機鹽類及 MS 有機鹽類培養基，添加 4 mg/l NAA 及1 mg/l kinetin，可直接誘導雜交胚產生 F_1 植株，而固體、液體培養對大量繁殖 F_1 植株的效果類似，但植株存活率以固體培養較佳。

關鍵詞：栽培稻、野生稻、胚培養。

前　　言

自1935年 Gotoh 等人以栽培稻（*Oryza sativa*）與野生稻（四倍體 *O. latifolia* 及二倍體 *O. cubensis*）進行雜交成功後[(10)]，即陸續有種間雜交染色體鑑定及病蟲害抗性方面之報告[(12)]，雖種間雜交不易獲得 F_1 材料。然因野生稻集團保存有多量的遺傳變異[(17)]、病蟲害抵抗性[(11)]及適應不良環境等特性[(21)]，因此經由稻屬種間之遠緣雜交，將野生稻遺傳變異性擴大至栽培稻，以減少稻作生產上於遺傳變異狹小之導因潛在危機，極有必要。克服種間雜交低稔性的方法，有胚培養[(3,14)]、子房培養[(22)]、試管授精後的胚珠培養[(8,18)]、秋水仙鹼（colchicine）處理[(20)]等，其中以胚培養最常被應用。Emerita 指出水稻授粉後6～7天的未熟胚，可大量誘得植株，但授粉後10天的未熟胚，誘得植株比率降低[(9)]；Chen *et al.* 以番茄種間雜交胚爲材料，取授粉後 7 天的未熟胚培養，可獲得80%以上的成活雜交胚，若授粉超過 7 天的未熟胚，則獲得雜交胚比率降低一倍以上[(6)]。

本試驗的主要目的在進行早期幼胚拯救培養及雜種 F_1 的大量繁殖，以供抗蟲及特性調查之用，提高作物育種效率。

材料與方法

本試驗選用稉稻臺農67號（TNG67）及秈稻臺中秈10號（TCS10）爲母本與二倍體 *O. officinalis* 野生稻（由 IRRI 種原庫引進）四個系統編號 W9（IRRI Acc.100878）、W20（IRRI Acc.101115）、W22（IRRI Acc.101137）、W37（IRRI Acc.100896）爲父本，分別進行雜交共有八個組合，取不同授粉後天數的小穎花，除去內外穎，經1%次氯酸鈉溶液振盪消毒10分鐘，用無菌水洗滌三次，取出未成熟胚，於溫度25±1°C，光強1,500lux，每日16小時光照下培養，進行以下的試驗：

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告第 1905 號。
2. 本所嘉義農業試驗分所助理研究員、研究員。臺灣省　嘉義市。
3. 國立中興大學農藝學系教授。臺灣省　臺中市。
4. 本所農藝系研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

一、幼胚培養培養基

㈠N6-K：N6 無機鹽類及 MS 有機成分，添加0.2 mg/l NAA、2 mg/l kinetin、3% 蔗糖及1%瓊脂，pH=5.7±0.1。

㈡N6-N：N6 無機鹽類及 MS 有機成分，另外添加 500 mg/l 水解酪蛋白（casein hydrolysate）、4mg/l NAA、1 mg/l kinetin、3% 蔗糖及1%瓊脂，pH=5.7±0.1。

二、F_1植株大量繁殖培養基

1/2 MS 基本鹽類，另外添加 0.2 mg/l NAA，2 mg/l kinetin 及3% 蔗糖爲基本培養基；再分固體（1%瓊脂，pH=5.7±0.1）或液體（pH=5.2±0.1）培養。

三、資料統計分析

在二項分布（binomial distribution）前提下，檢定癒合組織的形成率、根分化率及癒合組織的褐化率等項目之不同雜交組合間差異顯著性；而植株分化數以鄧肯氏多變域測驗法（Duncan's multiple-range test），進行不同處理平均值間之差異顯著性測驗。

結　　果

一、不同雜交組合與胚齡對癒合組織分化的影響

表 1 顯示八個不同雜交組合及授粉後 5～21日的不同胚齡，所獲得的雜交率均有不同，其中以 TNG67×W9、TCS10×W9、TNG67×W37 及 TCS10×W37 等四個雜交組合，所獲得的雜交成功率較高；而 TNG67×W37 及 TCS10×W37 二種雜交組合中，不同胚齡的雜交胚，直接誘導植株分化的比率較高，其中又以 TNG67×W37 組合之授粉後 7～9 日的雜交胚培養，可得60%以上的植株爲最佳；TNG67×W9 及 TCS10×W9 授粉後 5～7 日的雜交胚，對於癒合組織的誘導較其它雜交組合爲高；綜合以上結果顯示利用二個栽培稻與四個野生稻雜交所獲得八個雜交組合中，以 W9 及 W37 的野生稻爲父本時，似乎有較高的雜交率。

表 2 及圖 1 顯示不同雜交組合及胚齡的雜交胚，培養於含高濃度的 auxin 及低濃度的 cytokinin 培養基中，發現可直接誘導植株或擬胚狀的癒合組織。植株分化方面，以 TNG67×W37 雜交後 9 天的胚齡，誘導植株分化最佳，其次是11天胚齡所誘導的植株；而 6～7 天胚齡或其它雜交組合，誘導植株的分化較差；癒合組織的誘導方面，稉稻臺農67號的品種 7 天胚齡對癒合組織的誘導率較 5 天胚齡高，而秈稻臺中秈10號品種的結果相反；秈、稉稻與野生稻雜交的三個組合中，以 TNG67×W37 組合的授粉後 9 天及11天的未成熟胚培養，對於癒合組織的誘導率較佳達86%以上；其次 TCS10×W9、TNG67×W9 二組合的 9 天未成熟胚，癒合組織的誘導率分別達76%及77%，隨著胚齡的降低，癒合組織的誘導率明顯下降；並且發現各個雜交組合的癒合組織褐化率較秈稉兩品種（對照組）少；根的誘導方面，以 TNG67×W37組合的 7～9 天胚齡之效果較佳，而以秈稉兩型爲材料，培養的結果發現誘導根的效果均較差；以上結果顯示稉稻臺農67號×野生稻（W37）的雜交組合的 9 天胚齡培養時，可獲得較高的植株再生率及癒合組織形成率。

表 1. 不同雜交組合與胚齡對癒合組織分化的影響（1994年第一期作）

Table 1. Effect of cross-combination and embryo age on the formation of plantlet and callus from immature rice embryo cultured on N6-K medium (1st crop, 1994) [z]

Cross-combination	Embryo age (days after pollination)	No. of flowers pollinated	Embryos produced		Embryos forming plantlets		Embryos forming callus		Browned callus	
			No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
TNG67×W9	5	213	16	7.5	0		14	87.5	7	50.0
	7	448	56	12.5	1	1.8	49	87.5	33	67.3
	9	183	13	7.1	1	7.7	5	38.4	4	80.0
	21	301	37	12.3	1	2.7	5	13.5	4	80.0
TCS10×W9	5	167	2	1.2	0		2	100.0	2	100.0
	7	500	8	1.6	0		4	50.0	4	100.0
	9	180	0	0	0		0		0	
	21	301	25	8.3	0		5	20.0	3	60.0
TNG67×W20	7	250	0	0	0		0		0	
	9	202	1	0	0		1	100.0	0	
	21	223	27	12.1	2	7.4	5	18.5	4	80.0
TCS10×W20	5	301	2	0	0		2	100.0	2	100.0
	7	212	0	0	0		0		0	
	9	185	0	0	0		0		0	
	21	192	5	2.6	0		0		0	
TNG67×W22	5	286	4	1.4	0		2	50.0	0	
	7	302	0	0	0		0		0	
	9	400	8	2.0	0		5	62.5	2	40.0
	21	239	26	10.9	4	15.4	4	15.3	3	75.0
TCS10×W22	5	250	1	0	0		0		0	
	7	232	0	0	0		0		0	
	9	189	0	0	0		0		0	
	21	220	0	0	0		0		0	
TNG67×W37	5	146	24	16.4	7	29.2	5	20.8	5	100.0
	7	465	60	12.9	38	63.3	13	21.7	13	100.0
	9	462	6	1.3	5	83.3	0		0	
	21	129	36	28.0	13	36.1	1	2.8	0	
TCS10×W37	5	118	17	14.4	8	47.1	7	41.2	7	100.0
	7	426	20	4.7	6	30.0	7	35.0	6	85.7
	9	254	0	0	0	0	0		0	
	21	160	4	2.5	1	25.0	0		0	

[z] N6-K meduim：N6 inorganic salts, MS organic substance, 0.2mg/l NAA, 2mg/l kinetin and 3% sucrose, pH=5.7. Culture duration was 60 days.

表 2. 不同雜交組合與胚齡對癒合組織分化的影響（1994年第二期作）

Table 2. Effect of cross-combination and embryo age on the formation of plantlet and callus from immature rice embryo cultured on N6-N medium (2nd crop, 1994) [z]

Cross-combination	Embryo age (days after pollination)	No. of embryo cultured	No. of plants produced		Callus-forming embryos		Callus differentiated to form roots		Callus turned brown	
			Total	Average	No.	%	No.	%	No.	%
TNG67×TNG67	5	76	126ab[y]	1.66	43	56(45～64)[x]	3	7(0～15)	6	14(4～24)
	7	76	111ab	1.46	71	93(87～99)	7	10(3～17)	3	4(0～ 9)
TCS10×TCS10	5	40	26cd	0.65	17	43(28～58)	0	0	3	18(0～26)
	7	73	57c	0.82	12	16(7～24)	1	8(0～23)	2	17(0～38)
TNG67×W9	7	90	1e	0.01	13	14(7～21)	1	8(0～23)	0	0
	9	88	22de	0.25	68	77(68～86)	15	22(6～32)	0	0
TNG67×W37	6	50	4de	0.08	14	28(16～40)	3	21(0～42)	0	0
	7	100	11de	0.11	42	42(32～52)	22	52(37～67)	0	0
	9	180	353a	1.98	155	86(81～91)	55	35(28～43)	0	0
	11	61	69bc	1.15	55	90(83～98)	16	29(17～41)	1	12(3～21)
TCS10×W9	7	60	1e	0.03	23	38(26～50)	3	13(0～27)	0	0
	9	42	2de	0.05	32	76(63～89)	0	0	1	3(0～ 9)

[z] N6-N meduim : N6 inorganic salts, MS organic substance, 500 mg/l casein hydrolysate, 4mg/l NAA, 1mg/l kinetin and 3% sucrose, pH=5.7. Culture duration was 60 days.

[y] Means followed by the same letter are not significantly different at 5% level using Duncan's multiple range test.

[x] Data in parentheses are numbers computed at 95% confidence levels of binomial distribution.

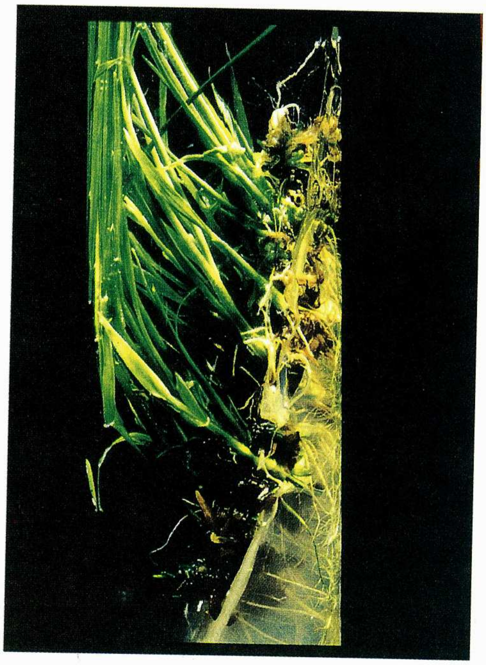

圖 1. 稉稻臺農67號×野生稻（*O. officinalis* 之 W37品系）雜交組合的 9 天胚齡，培養於 N6 無機鹽類、MS 有機鹽類添加 4mg/l NAA 及 1mg/l kinetin 誘導植株產生

Fig. 1. Plant regeneration from callus derived from 9-day-old immature embryo of Tainung 67 (*O. sativa*) ×W37 (*O. officinalis*). The regeneration medium contained N6 inorganic salts, MS organic substance, 4 mg/l NAA and 1 mg/l kinetin.

二、固態、液態培養基對繁殖速率的影響

將未成熟胚所形成的小苗（約1.5公分）培養於固體或液體培養基，皆能促進植株的繁殖，培養30天內植株的分化率，由 1 株增加爲2.3株；但液體培養超過30天對植株的存活率，似有不良的影響，植株成活率由15天的100%，降爲30天的70%，延長液體培養期間，植株存活率均維持在60～70%之間。固體培養對植株的分化率大抵和液體培養類似，30天內呈倍數的趨勢增加，以後至60天趨勢漸緩，植株成活率則較液體培養佳，經二個月培養之植株存活率仍可達95%（圖 2）。

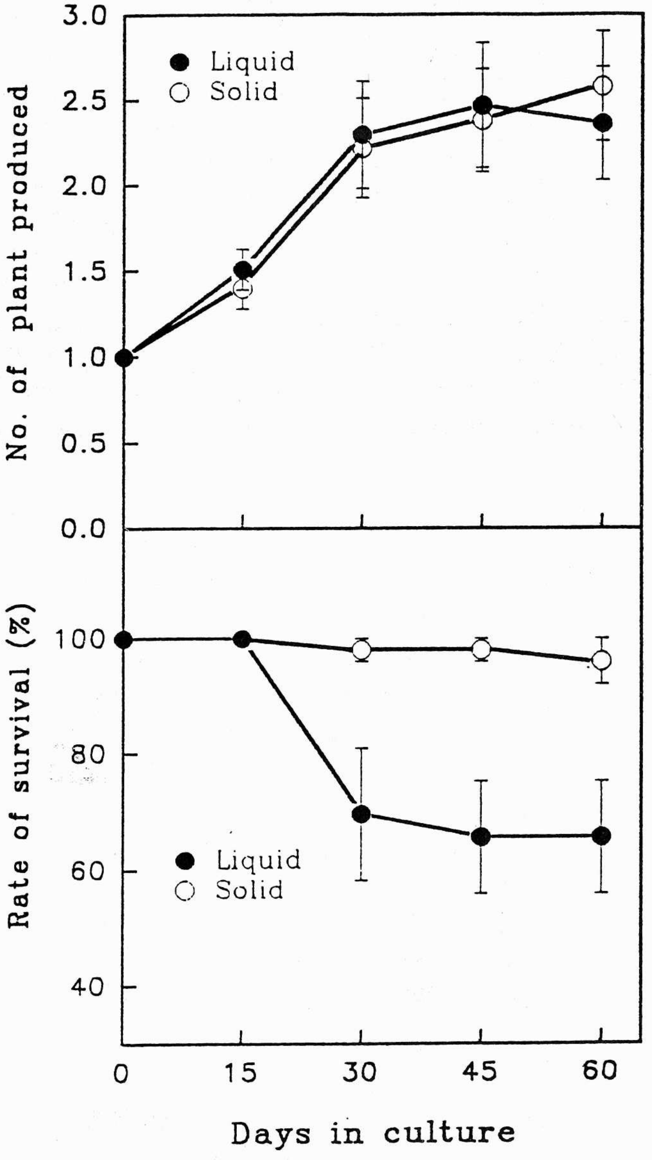

圖 2. 固態及液態培養基對稉稻臺農67號×野生稻(*O. officinalis* 之 W37品系)雜交組合，所形成的小苗繁殖效率的影響

Fig. 2. Relation between culture phase(solid or liquid)and the multiplication rate of cultured plantlets of Tainung 67 (*O. sativa*) ×W37 (*O. officinalis*) . The medium composition was 1/2 MS basic salts supplemented with 3% sucrose, 0.2 mg/l NAA, and 2 mg/l kinetin.

討　論

Chen *et al.* 報導含高 NO_3^- 之 N6 無機鹽類的培養基比含較高 NH_4^+ 的 MS 無機鹽類培養基，對水稻花葯癒合組織形成的效果高出兩倍[5]。Ko *et al.* 指出 NAA 及 kinetin 對水稻幼胚的發育有利[13]；含 2mg/l NAA 和0.3 mg/l kinetin 之培養基，有利於水稻花葯培養癒合組織的誘導率[4]。根據以上學者發現 NAA 及 kinetin 對水稻癒合組織形成及植株再生能力有良好的效果，因此本研究亦採用 N6 無機鹽類及 MS 有機鹽類爲主，另外添加 NAA、kinetin 及水解酪蛋白（casein hydrolysate），作爲水稻幼胚培養的培養基（表1，2）。Davoyan 以超過100個 *O. sativa* 品系爲母本，分別與不同類型的二倍體野生稻（*O. rufipogon*）及四倍體野生稻（*O. latifolia*）雜交，發現不同雜交組合之間對於癒合組織的形成及再生植株的分化是無相關的[7]。本試驗結果顯示秈、稉稻與 W37 野生稻雜交所誘導的植株較多，而秈、稉稻與 W9 野生稻雜交，所誘導的癒合組織形成率較高，顯示不同父本會影響胚形態發生的過程（表1）；改變 auxin 及 cytokinin 的比例，如在 4 mg/l NAA 及 1 mg/l kinetin 的培養基中，可使胚直接誘導植株或產生擬胚狀的癒合組織（embryogenic callus）（表2、圖1）。Ling *et al.* 曾指出以水稻未成熟小穗（immature panicle）直接培養於 MS、B5、N6 及 HE 等種類之培養基，添加低濃度 NAA 及 kinetin，可經由胚形成（embryogenesis）擬胚化癒合組織，並直接誘導植株分化[15,16]，本試驗與 Ling 等人的結果相似。Zhang and Chu 以 5×5 全互交 F_1 材料研究癒合組織及再生植株的遺傳機制，發現不同的父母本雜交組合中呈超顯性現象[24]；表 2 亦顯示稉稻的植株分化率及癒合組織形成率均高於秈稻，因此以稉稻爲母本，與特定野生稻（W37）雜交，授粉後 9 日的胚，對於癒合組織的形成及植株的分化優於其它雜交組合，甚至比原稉稻品種（對照組）稍佳。蔡以11個水稻栽培種爲材料，發現不同雜交組合中未熟胚癒合組織的形成率並無顯著差異，但不同雜交組合之癒合組織的生長率卻有差異，稉稻癒合組織的生長速率較秈稻爲快[2]。Emerita 也提出水稻以授粉後 6～7 天的未熟胚，可大量誘得植株，授粉後10天的未熟胚，誘得植株比率降低[9]；Shome and Bhaduri 報導水稻授粉後 7 日的胚較適合培養，甚至 5 日的胚也可培養成功[19]；Chen and Adachi 以番茄種間雜交胚爲材料，取授粉後 7 天的未熟胚培養，可獲得80%以上的雜交株，若超過授粉後 7 天的未熟胚，則獲得雜交株比率降低一倍以上[6]；本研究結果顯示第一期作雜交以授粉後 7～9 日（表1）及第二期作以授粉後 9 日（表2）爲適當胚培養時期，推測此差異可能爲第二期作孕穗期時溫度較第一期作爲低，造成未熟胚發育遲緩所致；Ko *et al.* 指出眞正影響分化的原因是雜交組合及父母本生長的條件，例如溫度；而胚齡非最直接的影響因子[13]；雜交胚因胚乳的敗育及遠緣種雜交組合的障礙，使胚經常發育較慢且多變化；選擇最佳雜交組合、胚齡及培養基等，可成功培養未熟雜交胚。

溫等指出水稻花葯行液體培養對癒合組織之誘導極有助益[1]。但 Tasy and Chen 指出液體培養所產生之水稻花葯癒合組織，其綠苗分化力幾近於零[23]。本研究顯示固體培養對於植株的繁殖率效果與液體培養極類似，但固體培養持續60天後，植株成活率仍維持在95%以上；而液體培養超過30天，植株的存活率降爲70%（圖2），可知液體培養不利於植株大量繁殖。

誌　謝

本試驗承蒙行政院農業委員會82科技—1・1—糧—56（24）及83科技—1・1—糧—61（33）計畫補助經費，文承本所副所長劉大江博士指導及斧正，謹此申謝。

引用文獻

1. 溫世政、莊志弘、葉常青、蔡新聲。1992。洋菜及糖類誘導之水份逆境對水稻花葯培養的影響。中華農藝 2：69—81。

2. 蔡錦瑩。1988。水稻未成熟胚培養：癒合組織的誘導、生長、分化及原生質體分離之研究。國立中興大學糧食作物研究所碩士論文。臺中市。

3. Ahmad, F. and A. Comeau. 1991. Production, morphology, and cytogenetics of *Triticum aestivum* (L.) Thell×*Elymus scabrus* (R. Br.) Love intergeneric hybrids obtained by in ovule embryo culture. Theor. Apple. Genet. 81：833—839.

4. Chaliff, R. S. 1983. Induction, maintenance, and differentiation of rice callus cultured on ammonium as sole nitrogen source. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2：29—37.

5. Chen, C. M., C. C. Chen, and M. H. Lin. 1982. Genetic analysis of anther-derived plants of rice. J. Hered. 73：49—52.

6. Chen, L. and T. Adachi. 1992. Embryo abortion and efficient rescue in interspecific hybrids, *Lycopersicon esculentum* and the *Peruvianum* complex. Jpn. J. Breed. 42：65—77.

7. Davoyan, E. I. 1987. Genetic determination of the process of callus formation and induction of regenerates in the tissue culture of rice. Genetika USSR 23：303—310.

8. Dhaliwal, S. and P. J. King. 1978. Direct pollination of *Zea mays* ovules *in vitro* with *Z. mays, Z. mexicanna* and *Sorghum bicolor* pollen. Theor. Apple. Genet. 53：43—46.

9. Emerita, V. 1983. Recent progress in rice embryo culture at IRRI. pp. 215—228. In: Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. International Rice Research Instiutue, Los Banos, Philippines.

10. Gotoh, K. and E. Okura. 1935. Cytological and genetical studies of *Oryza*. Jpn. Jour. Genet. 11：130—131.

11. Ikeda, R. and G. A. Busto. 1990. Resistance of wild rices to bacterial blight (BB). Int. Rice Res. Newsl. 15：14.

12. Katayama, T. 1982. Cytogenetical studies on the genus *Oryza*. VIII. Relationship between the genome E and D. Jpn. J. Genet. 57：613—621.

13. Ko. S. W., C. K. Wong, and C. S. Woo. 1983. A simplified method of embryo culture in rice of *Oryza sativa* L. Bot. Bull. Acad. Sin. 24：97—101.

14. Krauter, R., A. Steinmetz, and W. Friedt. 1991. Efficient interspecific hybridization in the genus *Helianthus* via "embryo rescue" and characterization of the hybrids. Theor. Apple. Genet. 82：521—525.

15. Ling, D. H., W. Y. Chen, M. F. Chen, and Z. R. Ma. 1983a. Somatic embryogenesis and plant regeneration in an interspecific hybrid of rice. Plant Cell Rep. 2：169—171.

16. Ling, D. H., W. Y. Chen, M. F. Chen, and Z. R. Ma. 1983b. Direct development of plantlets from immature panicles of rice *in vitro*. Plant Cell Rep. 2：172—174.

17. Oka, H. I. 1991. Genetic diversity of wild and cultivated rice. pp. 55—81. In: Rice

Biotechnology. (ed. by G. S. Khush and G. H. Toenniessen). International Rice Research Instittute, Manila, Philippines.

18. Reger, B. J. and J. James. 1982. Pollen germination and pollen tube growth of sorghum when crossed to maize and pearl millet. Crop Sci. 22 : 140—144.

19. Shome, A. and P. N. Bhaduri. 1982. *In vitro* culture of immature embryo of rice *Oryza sativa* L. Ind. J. Exp. Biol. 20 : 184—186.

20. Shoemaker, R. C. M. S. Heath, H. Skorupksa, X. Delannay, M. Edge, and C. A. Newell. 1990. Fertile progeny of a hybridization between *Glycine max* (L.) Merr. and *G. tomentella* Hayata. Theor. Apple. Genet. 80 : 17—23.

21. Sitch, L. A., R. D. Dalmacio, and G. O. Romero. 1989. Cross ability of wild *Oryza* species and their potential use for improvement of cultivated rice. Rice Genet. Newsl. 6 : 58—60.

22. Takahata, Y. 1990. Production of intergeneric hybrids between a C_3-C_4 intermediate species *Moricandia arvensis* and a C_3 species *Brassica oleracea* through ovary culture. Euphytica 46 : 259—264.

23. Tsay, H. S. and L. J. Chen. 1984. Effect of cold treatment on the rice anther culture. J. Agric. Res. China 127 : 8—17.

24. Zhang, Z. H. and Q. R. Chu. 1985. Biomertric analysis on anther culture ability in rice (*Oryza sativa L.*) . *Acta Agric. Shanghai* 1 : 1—10.

46-3-1

In Vitro Culture of Immature F₁ Embryos of *Oryza sativa* × *O. officinalis*[1]

Shu-Fung Lo, Yi-Sin Chen[2], Cheng-Chang Li[3] and Hsin-Sheng Tsay[4]

Summary

The frequency of callus formation and the subsequent plant regeneration from 7 to 9 day old embryo cultured *in vitro,* the cross between cultivar Tainung 67 of *O. sativa* and strain W37 of *O. officanalis,* was superior to the other seven crosses within the two distantly related species. The medium containing N6 inorganic salts, MS organic substance, supplemented with 4 mg/l NAA and 1mg/l kinetin facilitated the direct production of plantlets from the cultured hybrid embryos. Culture of the hybrid plantlets on solid or liquid medium showed no significant difference in their multiplication rate. However, the survival rate was higher on the solid than in the liquid medium.

Key words : *Oryza sativa, O. officinalis,* Embryo culture.

1. Contribution No. 1905 from Taiwan Agricultural Research Institute.
2. Respectively, Assistant Agronomist and Senior Agronomist, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Station, TARI, Chiayi, Taiwan, ROC.
3. Professor, Department of Agronomy, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
4. Senior Agronomist, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.